



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

Trabajo de Fin de Grado:

“Diseño y puesta a punto de un método *LAMP* (*Loop-mediated isothermal amplification*) para el diagnóstico de enfermedades producidas por cestodos”

M^a de Loreto Megido Domínguez

Grado en Biotecnología

Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS)
Departamento de Biología Animal, Ecología, Parasitología, Edafología y Química Agrícola de la
Universidad de Salamanca



FEBRERO DE 2016

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Cestodosis.....	1
1.1.1. Morfología y ciclo biológico del género <i>Taenia</i>	2
1.1.2. Especies infectivas para el ser humano, epidemiología y prevalencia	4
1.1.3. Patogenia, manifestaciones clínicas y tratamiento	6
1.1.4. Control y prevención	7
1.1.5. Diagnóstico	8
1.2. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo <i>LAMP</i> (<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>)	9
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Dianas de amplificación y cebadores utilizados en el método LAMP para la detección de <i>T. solium</i> , <i>T. saginata</i> y <i>T. asiatica</i>	13
3.2. Obtención de ADN de tenias y otros parásitos.....	14
3.3. Valoración, puesta a punto y optimización del LAMP para la amplificación de ADN de <i>T. solium</i> , <i>T. saginata</i> y <i>T. asiatica</i>	14
3.4. Detección de los productos de amplificación	16
3.5. Búsqueda de secuencias nucleotídicas para la detección específica mediante LAMP de <i>Taenia hydatigena</i> . Diseño y selección de cebadores	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1. Valoración, puesta a punto y optimización de las mezclas de reacción de los métodos LAMP descritos para la detección de <i>T. solium</i> , <i>T. saginata</i> y <i>T. asiatica</i>	17
4.2. Valoración de la especificidad de los distintos métodos LAMP	21
4.3. Valoración de la sensibilidad de los distintos métodos LAMP	21
4.4. Diseño y selección de cebadores específicos para la amplificación mediante LAMP de <i>Taenia hydatigena</i>	23
5. CONCLUSIONES.....	27
6. BIBLIOGRAFÍA	28
7. ANEXOS	

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cestodosis

Las **cestodosis** son enfermedades parasitarias producidas por helmintos de la clase *Cestoda* (*Phylum Platyhelminthes*). Esta clase agrupa a gusanos acintados, endoparásitos obligados de mamíferos, incluyendo al hombre. Teniendo en cuenta que durante la enfermedad el ser humano puede comportarse como hospedador definitivo o intermediario de estos parásitos, las cestodosis se clasifican en dos grupos: las **producidas por gusanos adultos**, en las que los humanos se comportan como hospedadores definitivos y albergan al parásito en su aparato digestivo; y las **producidas por fases larvarias**, en las que los humanos son hospedadores intermediarios y albergan fases quísticas en los tejidos (Muro *et al.*, 2010). En la Tabla 1 se recogen las principales especies de cestodos intestinales, así como sus hospedadores intermediarios (primarios y secundarios) y definitivos.

Tabla 1. Taxonomía y hospedadores de cestodos intestinales. HI: hospedador intermediario; HD: hospedador definitivo (Muro *et al.*, 2010).

Orden	Género	Especie	HI (1°)	HI (2°)	HD
<i>Pseudophyllidea</i>	<i>Diphyllobothrium</i>	<i>D. dalliae</i>	Copépodos	Peces de agua dulce	Humanos Perros Zorros
		<i>D. dendriticum</i>	Copépodos	Peces de agua dulce	Humanos Gaviotas Mamíferos
		<i>D. latum</i>	Copépodos	Peces de agua dulce	Humanos Mamíferos
		<i>D. alascense</i>	Copépodos	Lotas	Humanos Perros
		<i>D. nihonkaiensi</i>	Copépodos	Salmones	Humanos Osos
		<i>D. pacificum</i>	Copépodos	Peces marinos	Humanos
		<i>T. solium</i>	Porcinos		Humanos
		<i>T. saginata</i>	Bovinos		Humanos
		<i>T. asiatica</i>	Porcinos		Humanos
		<i>H. nana</i>	Coleópteros Pulgas Piojos		Humanos
<i>Ciclophyllidae</i>	<i>Taenia</i>	<i>H. diminuta</i>	Copépodos		Humanos Ratas Ratones
		<i>D. caninum</i>	Pulgas Piojos		Humanos Perros Gatos
	<i>Hymenolepis</i>				
<i>Ciclophyllidae</i>	<i>Dipylidium</i>				
	<i>Dipylidium</i>				

El presente trabajo se centra en las **teniasis** o **teniosis**, enfermedades parasitarias intestinales causadas por las formas adultas de los cestodos del género *Taenia* (las comúnmente denominadas tenias), y también por las formas larvarias, de mayor gravedad clínica, que causan **cisticercosis** y **cenurosis** (Hoberg, 2002). La clasificación del género *Taenia* se realiza en función de sus características larvarias, ya que en estadios adultos son muy similares morfológicamente. Existen 40

especies descritas, y 4 subespecies (Hoberg, 2002). Tres especies tienen como hospedador definitivo al hombre: *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica*. Otras especies como *T. multiceps*, *T. serialis* o *T. taeniaeformis* también pueden producir excepcionalmente infecciones humanas al entrar el hombre en contacto con animales infectados. Hasta la fecha no se han descrito infecciones por *T. hydatigena* en seres humanos, pero su estudio tiene interés en clínica veterinaria ya que pueden aparecer coinfecciones con *T. solium* en el ganado porcino, dificultando el diagnóstico serológico al producir reacciones cruzadas entre ambas y causando importantes pérdidas económicas al tener que descartar la carne para el consumo humano.

1.1.1. Morfología y ciclo biológico del género *Taenia*

Las tenias son gusanos aplanados pertenecientes a la subfamilia *Taeniidae*. Estructuralmente los cestodos adultos presentan tres partes diferenciadas: **escólex o cabeza** (Figura 1), donde se localizan los órganos de fijación del parásito, como ventosas (*T. saginata*, *T. asiatica*) o ganchos en una fila (*T. solium*) o varias (*T. hydatigena*), formando una estructura que se denomina **rostelo** (Hoberg, 2002); **cuello** con funciones metabólicas activas, encargadas del origen de los anillos, y el **cuerpo o estróbilo**, de longitud variable (3-12 metros), dividido en segmentos denominados **proglótides**. Según el desarrollo del aparato reproductor, las proglótides se denominan inmaduras, maduras o grávidas.

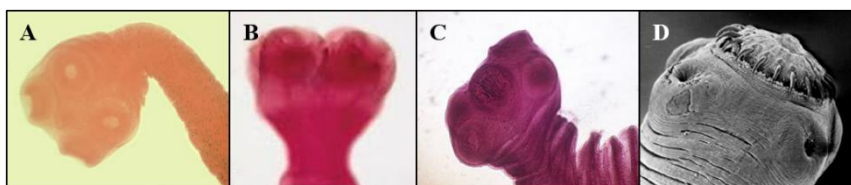


Figura 1. Escólex de las tenias. **A.** *T. solium* (Wikipedia.org). **B.** *T. saginata* (cdc.gov). **C.** *T. asiatica* (Anantaphruti, 2013). **D.** *T. hydatigena* (Società Italiana di Parassitologia).

Las tenias son **hermafroditas** y pueden reproducirse por fecundación cruzada o por autofecundación, a través de poros genitales alternos de las proglótides maduras que pueden combinarse entre ellos. Tras la fecundación, la proglótide que contiene los huevos es expulsada al exterior.

El **ciclo biológico** de las tenias es uno de los mejor estudiados en Parasitología, siendo el primer ciclo de vida complejo (indirecto) descrito para un parásito intestinal. Su transmisión se demostró hace aproximadamente 150 años (Hoberg, 2002).

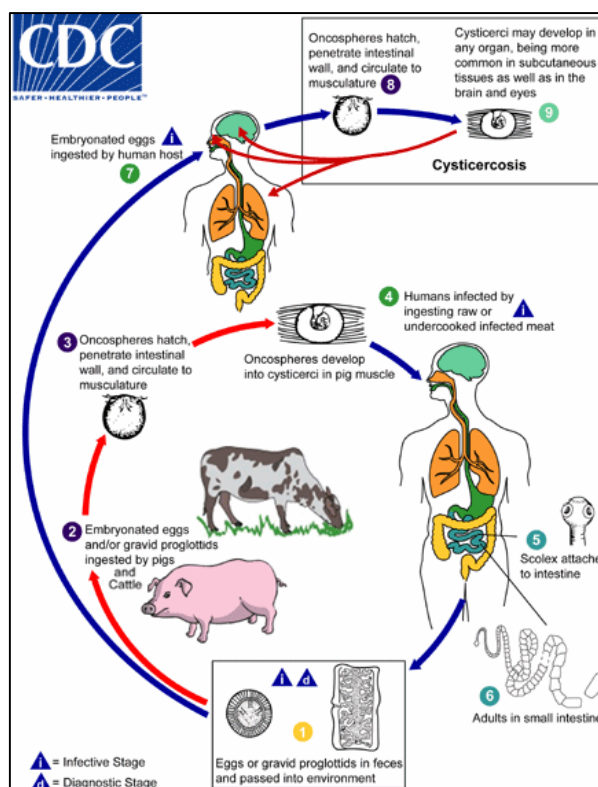


Figura 2. Ciclo biológico de las especies de *Taenia* que infectan a humanos. 1. Huevos o proglótidos grávidos que pasan de las heces al entorno. 2. Ingestión de huevos por los hospedadores intermediarios. 3. Formación de cisticercos en los tejidos. 4. Ingestión de los cisticercos por humanos a partir de carne infectada. 5. Fijación del escólex al intestino. 6. Los adultos se desarrollan en el intestino delgado. 7. El ser humano ingiere huevos con oncosferas. 8. Formación de los cisticercos en los tejidos. 9. Desarrollo de cisticercos en cualquier tejido (tomado con modificaciones de CDC, 2013).

Las tenias son los únicos parásitos cuyos hospedadores intermediarios y definitivos son mamíferos (Hoberg, 2002). El hospedador intermediario es un herbívoro o un omnívoro (cerdo para *T. solium* y *T. asiatica*; vaca para *T. saginata*). El ciclo biológico (Figura 2) comienza con la ingesta de agua o comida contaminadas con huevos de tenia procedentes de la liberación de proglótidos grávidos por un hospedador infectado (humano o animal) (Ito, 2015). Los huevos contienen **oncosferas**, larvas de tenia que pueden sobrevivir en el medio externo hasta ser ingeridas por un hospedador definitivo (Figura 3A). Estas oncosferas se liberan en el intestino y circulan a través de la pared intestinal hasta la musculatura o los órganos viscerales, pudiendo alcanzar el sistema nervioso central (SNC). Allí se desarrollan los metacestodos (fase larvaria intermediaria o juvenil, Figura 3B) y se forman los quistes, que con el paso del tiempo calcifican. Si la infección se ha producido por *T. solium* reciben el nombre de **cisticercos** y pueden formarse en cualquier tejido. Si se desarrollan en el SNC provocan **neurocisticercosis**, una grave infección considerada desatendida y olvidada en zonas de pobreza (CDC, 2014).

La ingestión por parte del hombre de carne cruda o mal cocinada del hospedador intermediario provoca **teniasis**: el desarrollo del adulto de tenia en el intestino (Figura 3C). Una vez que el adulto

se ha formado, comienza la liberación de proglótides maduras y grávidas, lo que dispersa los huevos para transmitir la enfermedad y mantener el ciclo (CDC, 2014).

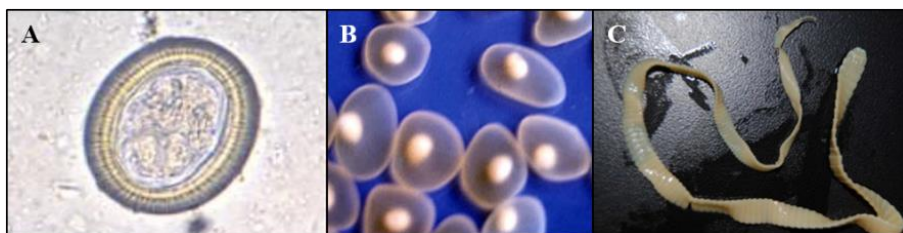


Figura 3. Morfología de *Taenia* spp. en función de la fase biológica en la que se encuentra. **A.** Huevo que contiene oncosferas. **B.** Metacestodo. **C.** Fase adulta extraída de un intestino humano. (cdc.gov; facmed.unam.mx; practicasinvertebradosuam2012.blogspot.com.es).

Existen otro tipo de infecciones accidentales cuando el ser humano no es el hospedador definitivo pero ingiere huevos o proglótides grávidas de especies que parasitan a otros mamíferos, principalmente al perro. Los quistes derivados de esta situación se denominan cenuros (Hoberg, 2002).

1.1.2. Especies infectivas para el ser humano, epidemiología y prevalencia.

Las infecciones producidas por tenias están muy extendidas a nivel mundial, con especial incidencia en zonas rurales y pobres (WHO, 2009); la falta de un método de diagnóstico rápido y efectivo y la dificultad de control en lugares sin recursos hacen que sea muy complicado establecer un número real de infectados. Su impacto global se equipara al del dengue o la tripanosomiasis en cuanto a desajustes físicos por la infección y a la duración de la misma (Bobes *et al.*, 2014). Las zonas pobres y rurales son de mayor riesgo de infección debido a que las condiciones más insalubres facilitan el contacto con las heces de animales infectados (Hoberg, 2002).

Las principales diferencias entre las especies infectivas para el ser humano radican en su distribución geográfica, en sus hospedadores intermediarios y en la estructura del escólex de su fase adulta.

- ***Taenia solium***. Se distribuye a nivel global y es la especie más abundante. Es más común en países donde se consume cerdo, ya que éste es su hospedador intermediario (Hoberg, 2002). Un solo parásito puede sobrevivir en el lumen intestinal hasta 25 años, lo que supone una elevada diseminación de los huevos y una mayor expansión de la enfermedad. Se trata de la especie más patogénica, produce síntomas inespecíficos e incluso puede ser asintomática, siendo el único signo claro de infección la liberación de proglótides en las heces (Hoberg, 2002). La ingestión accidental de huevos por parte del ser humano induce fases quísticas, generando la denominada **cisticercosis**. Si los quistes se forman en el cerebro se alcanza una fase muy grave de la enfermedad, la

neurocisticercosis (Figura 5A). Los datos más próximos a la realidad en cuanto a prevalencia de neurocisticercosis que se conocen corresponden a África Subsahariana: unos 6,16 millones de personas están infectadas (Winkler, 2012). Además, es la responsable de un 29% de los casos de epilepsia a nivel mundial (WHO, 2009; Winkler, 2012). En países no endémicos (EEUU, Canadá, Japón, Australia, Europa, e incluso países musulmanes), se ha observado un claro incremento de casos, principalmente importados (Gabriël *et al.*, 2015), hasta el punto de que la neurocisticercosis se ha convertido en una enfermedad prevalente en EEUU (Bobes *et al.*, 2014). En la Figura 4 se observan las áreas geográficas consideradas en riesgo de cisticercosis en el año 2011 según el último informe emitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2011).

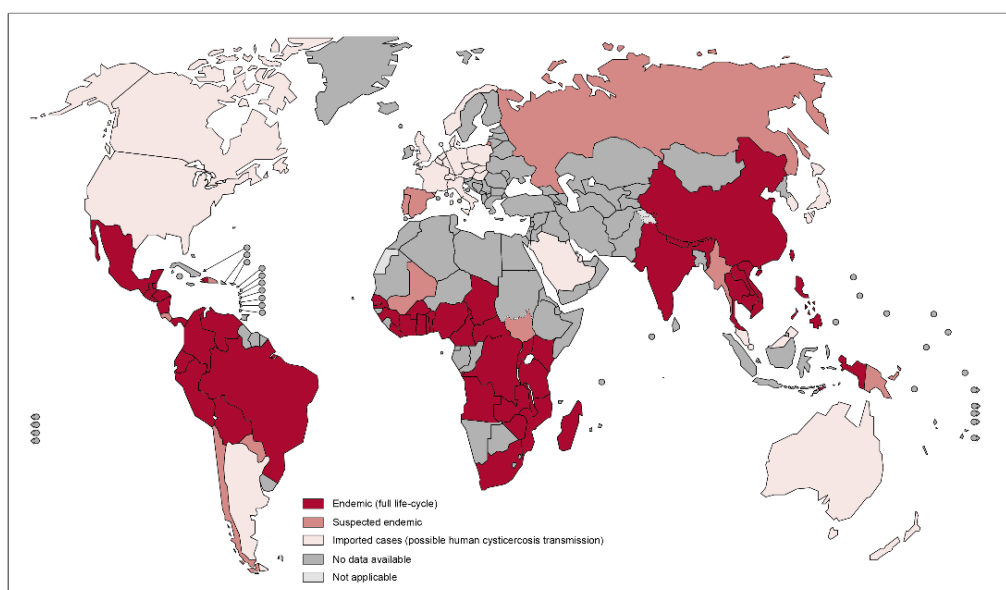


Figura 4. Áreas en riesgo de cisticercosis en el año 2011 (WHO, 2011).

- ***Taenia saginata*.** También presenta una distribución global y es adquirida por el consumo de carne de vacuno infectada. Al igual que la infección producida por *T. solium*, los síntomas son inespecíficos, aunque la longitud que puede alcanzar en el lumen intestinal (unos 10 metros) puede generar cuadros sintomáticos más graves (CDC, 2013). No produce fases quísticas en el hombre, por lo que su implicación en la salud pública es menor, aunque sí en el ganado vacuno, generando pérdidas económicas importantes (Figura 5B) (Hoberg, 2002). Un humano infectado libera a diario varios segmentos que contienen miles de huevos y en ambientes rurales el ciclo se perpetúa entre el ganado vacuno y los ganaderos.

- ***Taenia asiatica*.** Sólo parasita al ser humano. Es diferente a las otras especies y más específica, pero cercana a *T. saginata* (Hoberg, 2006). Su hospedador intermediario es el cerdo o el jabalí salvaje (Hoberg, 2002). No se manifiesta en fases quísticas en humanos. Su distribución está limitada al sureste de Asia, donde es endémica: Taiwán, Indonesia, Corea, Sumatra (Anantaphruti, 2013). En China, la cisticercosis por infecciones accidentales supone un importante problema de salud nacional

(WHO, 2009). La detección de las infecciones también se realiza por la liberación espontánea de proglótides en heces. Los factores socioculturales de esta zona de Asia influyen enormemente en la supervivencia de la especie por la gran ingesta de carne poco cocinada, especialmente vísceras (hígado) (Hoberg, 2002).

- ***Taenia hydatigena***. La infección por esta especie genera graves problemas en veterinaria, aunque aún no se ha descrito ninguna infección provocada en humanos (Hoberg, 2002), y es complicado diferenciarla de *T. solium* durante el diagnóstico serológico. El hospedador definitivo de este parásito es el perro, y como hospedadores intermediarios pueden actuar vacas, ovejas, cabras y ocasionalmente caballos y cerdos. En todos ellos genera fases quísticas en las que el parásito se denomina *Cysticercus tenuicollis* (Junquera, 2015) formando cisticercos de hasta 8 cm. Las infecciones se dan en todo el mundo y la prevalencia puede alcanzar el 80% del ganado ovino en algunas regiones. Se producen por contacto directo con heces de perros infectados por la fase adulta (Junquera, 2015).

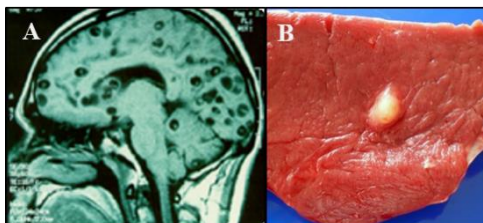


Figura 5. Quistes de tenias. **A.** Neurocisticercos de *T. solium* alojados en un cerebro humano. **B.** Quiste de *T. saginata* en carne de vacuno. (facmed.unam.mx; practicasinvertebradosuam2012.blogspot.com.es).

1.1.3. Patogenia, manifestaciones clínicas y tratamiento

Los mecanismos de agresión de las tenias intestinales se basan principalmente en factores mecánicos por alteración de la mucosa intestinal al fijarse por las ventosas y/o ganchos del escólex. Las reacciones inflamatorias son leves y las perforaciones son raras. Los mecanismos de defensa frente a las tenias son limitados y la respuesta inmune generada no modifica la duración de las parasitosis o la susceptibilidad del hospedador a la reinfección. Las consideraciones sobre aspectos patogénicos de las teniasis exceden los límites de este trabajo; sin embargo, existen trabajos actuales donde pueden consultarse distintos aspectos sobre la patogenia: Ale *et al.*, 2014; Bobes *et al.*, 2014; García *et al.*, 2014; Ito, 2015.

El principal riesgo de las infecciones producidas por tenias reside en la larga duración de las fases asintomáticas de las infecciones (Hoberg, 2002). La **teniasis** producida por las fases adultas presenta cuadros clínicos poco concluyentes, y el gusano adulto puede sobrevivir hasta 25 años en el intestino del paciente si no hay tratamiento (Hoberg, 2002). En general, una mayor longitud del adulto produce

más síntomas, entre los que se incluyen: malestar general, pérdida de peso, incremento del apetito, mareos, vómitos, dolor abdominal, diarrea y catarro (Hoberg, 2002; CDC, 2013; WHO, 2014). La evidencia de la infección es la liberación espontánea de proglótides en las heces (Hoberg, 2002). El tratamiento habitual es una dosis de *Praziquantel* de 5-10 mg/Kg o una dosis de *Niclosamida* de 2 g acompañada de exámenes de heces para control durante 3 meses (CDC, 2013).

La **cisticercosis** y la **cenurosis** se manifiestan como protuberancias bajo la piel en los tejidos afectados, y los síntomas pueden agravarse llegando a provocar glaucomas, linfomas, lipomas, etc. (CDC, 2014). Para tratar los quistes puede utilizarse *Praziquantel* y *Niclosamida* en las mismas dosis señaladas anteriormente, y en ocasiones, puede requerirse la extracción quirúrgica (CDC, 2014).

La **neurocisticercosis** manifiesta síntomas de mayor gravedad. Como ya se ha señalado, es la responsable de casi el 30% de los casos de epilepsia a nivel mundial (Winkler 2012; 2015). Además, produce crisis convulsivas, confusión, problemas de equilibrio, hidrocefalia y, si no se diagnostica a tiempo, la muerte (CDC, 2014; Winkler & Richter, 2015; WHO, 2014). El tratamiento es la extracción quirúrgica de los quistes, en especial si éstos se han calcificado en el tejido neuronal. Suele administrarse *Praziquantel* con *Albendazol* y *Dexametasona* para evitar las crisis epilépticas (CDC, 2014).

1.1.4. Control y prevención

Controlar la transmisión de infecciones producidas por tenias es complicado por la dificultad del diagnóstico y del acceso médico a las zonas endémicas. Tienen especial relevancia las infecciones por *T. solium*, ya que provocan numerosos casos de cisticercosis a su alrededor. Para la prevención, la OMS ha llevado a cabo diversas campañas, principalmente en Sudamérica, donde en prácticamente todos los países las infecciones se consideran endémicas, a pesar de que no existe ninguna especie endémica de la región (Hoberg, 2002). En los últimos años se han llevado a cabo varias iniciativas para frenar la transmisión de la enfermedad con vacunas para cerdos, prevención y educación de la población (WHO, 2009). Las campañas de prevención, tanto en Sudamérica (Perú, 2003-2010) como en otras zonas de escasos recursos, se centran en la concienciar a la población de la necesidad del aseo personal y de mantener unas condiciones de salubridad adecuadas, manteniendo a los animales (transmisores potenciales) en zonas separadas de los seres humanos y evitando el contacto con sus heces y con los alimentos o el agua que ellos hayan podido contaminar. Además, es importante evitar el consumo de carne cruda o mal cocinada, porque los cisticercos sobreviven en la carne cruda (CDC, 2013).

El objetivo principal es frenar la cadena de transmisión de la enfermedad, es decir, interrumpir el contagio entre hospedadores intermediarios y definitivos. En esta línea se ha desarrollado una vacuna comercializada para uso animal denominada **Tsol18**. Se trata de una proteína recombinante que se administra a los cerdos para evitar la transmisión. La administración es complicada ya que son necesarias varias dosis y los animales deben estar libres del parásito en el momento de la administración (García *et al.*, 2010).

1.1.5. Diagnóstico

El diagnóstico de teniasis y cisticercosis es complicado y poco exacto (Hoberg, 2002). La identificación de la especie causal es crucial, en especial en las **teniasis** producidas por *T. solium*, puesto que el portador es fuente de cisticercosis para su entorno. El diagnóstico se realiza mediante el examen microscópico de heces para detectar huevos y proglótides, tarea ardua y poco sensible. Las heces deben recolectarse en tres días distintos. Los huevos de tenia pueden detectarse en las heces de 2 a 3 meses después del inicio de la infección. (CDC, 2013; Thomas, 2015). El método serológico más efectivo es el ELISA copro-antigénico, que es más sensible que cualquier coprología de rutina (WHO, 2009), pero no es específico y es una prueba cara que no siempre logra un resultado concluyente (Thomas, 2015).

Para la **cisticercosis** y la **neurocisticercosis** la situación es similar. La persistencia de la fase asintomática dificulta el diagnóstico, que se lleva a cabo por exploración física y biopsia de los nódulos subcutáneos o neuroendoscopia (WHO, 2009). También se realiza diagnóstico por imagen (TAC, REM), inviable en zonas endémicas (CDC, 2014), y ELISA antígeno-específico con anticuerpos recombinantes, que actualmente no detecta los cisticercos que se han calcificado por el paso del tiempo (Winkler, 2012).

En lo referente al **diagnóstico molecular**, se han desarrollado técnicas para la detección de ADN de tenias. Mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y sus variantes (PCR a tiempo real, PCR-multiplex) se ha logrado la diferenciación de especies utilizando muestras de heces, huevos y proglótides (WHO, 2009). Se han diseñado y publicado varios métodos con el fin de diferenciar especies y realizar un diagnóstico certero de la infección (Jia *et al.*, 2010; Roelfsema, 2016). Este tipo de herramientas son muy específicas y sensibles, sin embargo los requerimientos técnicos, de personal especializado y el coste económico las convierten en inviables para su aplicación rutinaria en zona de campo (WHO, 2009). Ésta es la razón por la que deben emplearse nuevas alternativas moleculares en el diagnóstico de las teniasis. En el año 2000 se describió por primera vez el método **LAMP** (*loop-*

mediated isothermal amplification) (Notomi *et al.*, 2000), técnica que presenta elevada especificidad, sensibilidad y potencialidad de ser aplicada en campo (Mori *et al.*, 2013). Se trata de una amplificación de ADN en condiciones isotérmicas que permite una identificación visual del resultado sin necesidad de equipos especializados, lo que disminuye considerablemente el coste y permite su fácil aplicación en estudios de campo en zona endémica (Tomita *et al.*, 2008; Zhibing *et al.*, 2001). A continuación, se expone brevemente el funcionamiento de la técnica.

1.2. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*)

La amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP) fue desarrollada en el año 2000 (Notomi *et al.*, 2000). Es una técnica que amplifica ADN con gran especificidad, selectividad, eficiencia y rapidez en condiciones isotérmicas. Se basa en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de cadena llevado a cabo por una polimerasa con alta actividad de desplazamiento, la **Bst** ADN Polimerasa de *Bacillus stearothermophilus*, y en un sistema de **4 a 6 cebadores**: dos internos – *Forward Inner Primer* (FIP) y *Back Inner Primer* (BIP) – y dos externos, F3 y B3, capaces de reconocer entre seis y ocho secuencias diferentes en el ADN diana. Adicionalmente existen otros dos cebadores que ayudan a la formación del bucle de amplificación, FLP y BLP (Figura 6).

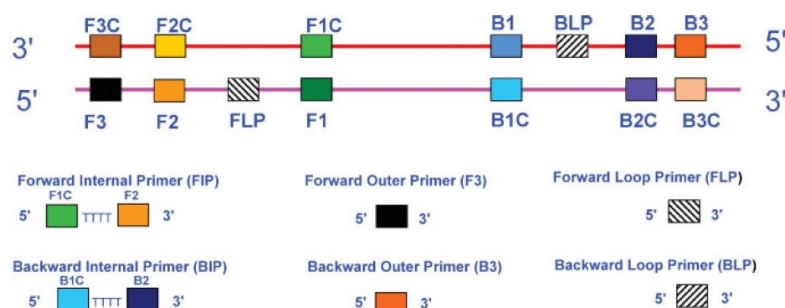


Figura 6. Esquema de la unión de los cebadores al ADN. F3 y B3 son complementarios a las secuencias F3c y B3c, respectivamente. El cebador FIP contiene la secuencia F1c, un espaciador TTTT y la secuencia F2. La estructura de B1c es idéntica con las secuencias B1c y B2. (Parida *et al.*, 2008).

El hecho de que la secuencia diana sea reconocida por seis secuencias independientes en la etapa inicial y por cuatro secuencias independientes en la fase final de la reacción otorga una elevada especificidad a la técnica, resolviendo uno de los problemas de otras técnicas de amplificación de ADN (Notomi *et al.*, 2000). En el apartado “7. ANEXOS” (epígrafe 7.1) se indica el esquema del funcionamiento de la técnica. Además, en el siguiente enlace (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html>) está disponible una animación del mismo.

El **procedimiento** de la realización de la técnica LAMP consta de tres etapas, con una duración total aproximada de 90 minutos.

1. *Extracción del material genético de las muestras.* No es un paso obligatorio. Varios ensayos han demostrado la posibilidad de no llevar a cabo este paso por la mayor tolerancia del LAMP que otros métodos moleculares (como la PCR) a muestras biológicas y componentes de cultivo (Kaneko *et al.*, 2007; Paris *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2008). Esta ventaja reduce el coste final y el tiempo necesario para la ejecución de la técnica.
2. *Amplificación del material genético en condiciones isotérmicas.* Para el LAMP no son necesarios ciclos de cambio de temperatura para la separación de las hebras como sucede en la PCR. Las condiciones isotérmicas de la reacción entre 60°C y 65°C permiten prescindir de un termociclador y utilizar un simple baño de agua o un termobloque (Snounou, 2007; Nkouawa *et al.*, 2012).
3. *Detección del ADN.* Puede hacerse de forma visual y además, cuantificarse. En la reacción se produce pirofosfato de magnesio (un subproducto de la reacción), cuya cantidad es proporcional a la cantidad de ADN que se amplifica (Han *et al.*, 2007). El pirofosfato de magnesio generado se aprecia a simple vista en forma de turbidez blanquecina (Mori *et al.*, 2001; Kuboki *et al.*, 2003). También pueden emplearse compuestos fluorescentes como el SYBR Green I, que evidencian un resultado positivo por cambio de color (Figura 7). Por último, la electroforesis en gel de agarosa permite la obtención de un patrón de bandas típico “en escalera”, a diferencia de la única banda que se obtiene tras la PCR, por los fragmentos de ADN de distinto tamaño que se producen.

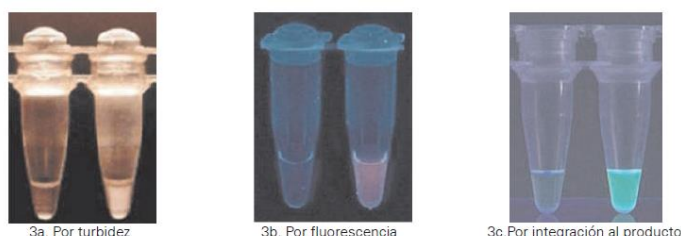


Figura 7. Métodos de detección visual de los productos generados en el método LAMP. (Adaptado de Mori & Notomi, 2009).

Actualmente se han desarrollado y descrito varios métodos LAMP para la detección de ADN de virus (Parida *et al.*, 2004; 2005; 2006), bacterias (Sekiguchi *et al.*, 2007; Arai *et al.*, 2015), y multitud de parásitos, entre otros *Trypanosoma* spp. (Kuboki *et al.*, 2003; Njiru *et al.*, 2008), *Plasmodium* spp. (Poon *et al.*, 2006), *Fasciola hepatica* (Ai *et al.*, 2010), *Schistosoma mansoni* (Fernández-Soto *et al.*, 2014a), *S. haematobium* (Gandasegui *et al.*, 2015) y *S. japonicum* (Xu *et al.*, 2010), *Loa loa* (Fernández-Soto *et al.*, 2014b), *Wuchereria bancrofti* (Takagi *et al.*, 2011), *Brugia* spp. (Poole *et al.*, 2012).

Con respecto a la detección de ADN de tenias mediante LAMP, en el año 2009 se publicó un método capaz de detectar ADN de *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica* (Nkouawa *et al.*, 2009) que posteriormente se aplicó en el diagnóstico utilizando heces humanas de pacientes con teniasis (Nkouawa *et al.*, 2010) y, además, en zona de campo (Nkouawa *et al.*, 2012). Este método se intentó reproducir en el Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III de Madrid (ISCIII) sin éxito, no pudiendo llevar a cabo la puesta a punto de la técnica. Desde este Centro, y en colaboración con *CYSTINET* (Red Europea para el estudio de teniasis/cisticercosis) se solicitó al CIETUS una valoración y puesta a punto del método descrito, teniendo en cuenta la experiencia previa en el diseño de métodos LAMP para otros parásitos (Fernández-Soto *et al.*, 2014a; 2014b; Gandasegui *et al.*, 2015).

Con todas estas características, el método LAMP se presenta como una alternativa potencial a los métodos diagnósticos clásicos y poco efectivos que se realizan en zonas endémicas. La OMS recomienda que un test diagnóstico en países en desarrollo debe ser asequible, sensible, específico, robusto, fácil de usar, sin equipamiento y disponible para un diagnóstico rápido (WHO, 2009). Junto a los test de un solo paso, el LAMP se ha señalado como un método de diagnóstico de posible aplicación en países en desarrollo en el futuro (Zablon *et al.*, 2012) y, al igual que para otras infecciones, potencialmente aplicable al diagnóstico de las teniasis.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se ha señalado, el diagnóstico de las infecciones producidas por tenias presenta numerosas dificultades, como la baja sensibilidad de la identificación microscópica, la escasa especificidad de las pruebas inmunológicas, las complicaciones técnicas y el coste económico de los métodos moleculares que limitan su aplicación en las zonas endémicas de la enfermedad. Por tanto, existe la necesidad de un nuevo método diagnóstico rápido y específico, fácil de aplicar e interpretar y de bajo coste.

El método LAMP es una herramienta potencial para cubrir las necesidades existentes en la actualidad en el diagnóstico de las teniasis. Existen trabajos previos sobre el desarrollo y aplicación de métodos LAMP para la detección de ADN de tenias, incluyendo *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica* (Nkouawa *et al.*, 2009; 2010; 2012). Se trató de desarrollar y reproducir sin éxito estos métodos en el Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III como uno de los objetivos previstos para el desarrollo de nuevas herramientas moleculares de diagnóstico de teniasis incluidos en las acciones del Grupo Europeo de Trabajo sobre Teniasis/Cisticercosis (CYSTINET; *European Network on Taeniasis/Cysticercosis*; www.cystinet.org). Teniendo en cuenta la experiencia previa del CIETUS en el desarrollo de métodos LAMP para la amplificación de ADN de otros parásitos, se solicitó nuestra colaboración para su puesta a punto y posible optimización, así como para el desarrollo de nuevos métodos LAMP para otras especies de tenias con posible implicación sanitaria.

Por ello, en el presente trabajo se fijó como **objetivo principal** la puesta a punto y optimización de un método LAMP para la detección de tenias que resulte eficaz y reproducible en distintos laboratorios y aplicable en condiciones de campo en zonas endémicas de la enfermedad. Además, se planteó el diseño *in silico* de un nuevo método LAMP para la detección de *T. hydatigena*.

Como **objetivos específicos** se definieron los siguientes:

1. Valoración, puesta a punto y optimización de las mezclas de reacción de los métodos LAMP previamente descritos para la detección de *T. solium*, *T. saginata*, y *T. asiatica*.
2. Valoración de la especificidad de los distintos métodos LAMP.
3. Valoración de sensibilidad de los distintos métodos LAMP.
4. Búsqueda y selección de secuencias nucleotídicas específicas de *T. hydatigena* para ser utilizadas como dianas para el desarrollo de un método LAMP: diseño de cebadores.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Dianas de amplificación y cebadores utilizados en el método LAMP para la detección de *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica*

Para la valoración, puesta a punto y optimización de las mezclas de reacción de los métodos LAMP descritos previamente en la literatura para la detección de tenias, se utilizaron los juegos de cuatro cebadores diseñados por Nkouawa *et al.* (2009). El trabajo describe dos juegos de cebadores diferentes para cada especie de tenia: el primero, específico para cada especie, está basado en el gen mitocondrial de la citocromo c oxidasa (*cox1*); el segundo está basado en el gen nuclear de una cisteín-peptidasa L (*clp*) que amplifica tanto ADN de *T. saginata* como de *T. asiatica*. Se seleccionó el primer juego de cada especie para la amplificación por su especificidad. Además, el ADN mitocondrial se considera más específico para actuar como diana en una amplificación. Las secuencias de los cebadores para la amplificación específica de *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica* se recogen en la Tabla 2. Los cebadores fueron sintetizados por SIGMA-ALDRICH® y facilitados por el Servicio de Microbiología del ISCIII.

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los cebadores para la amplificación específica de *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica* basados en el gen *cox1*. El cebador FIP consiste en la unión de las secuencias F2 en el extremo 3' y F1c en el extremo 5' (complementaria a la región F1). Del mismo modo, BIP está formado por la unión de B2 en el extremo 3' y B1c en el extremo 5'. (Tomado con modificaciones de Nkouawa *et al.*, 2009).

Especie	Primer set	Cebador	Secuencia (5' a 3')
<i>T. solium</i>	Tsol-cox1	F3	CCTATTTTAATTGGAGGTTTGG
		B3	CTACCCCACTTCTCTTGA
		FIP	CAACCATGCACCTAAAGCATTCAAATTCATTGATAAGAGGATTATCGG
		BIP	GGATGTGTTTAGGCGCTGGTACAACGAAGATGATAAAGGTG
<i>T. saginata</i>	Tsag-cox1	F3	TCGGCAAATATTTAATTCCTTTG
		B3	AAATTCTAGACGCACCCG
		FIP	GCCATCGAAGGAATCAATAACCAATCTGATTTGAATTTACCCCG
		BIP	GACTTTTATCCGCCTTTGTCTGTAATGCAACGAAAACATCAAGA
<i>T. asiatica</i>	Tasi-cox1	F3	GATTTTCTTTTTTTTGATGCCCA
		B3	TTGAAAATAATGACGACGACA
		FIP	AGGCAAGTTTAAATCAGATAACCCATTTTGATAGGTGGTTTGGTAA
		BIP	GTGGTTGTTGATTCTTCAATAGTTTAAGGCGGATAAAAAGTTCAC

3.2. Obtención de ADN de tenias y otros parásitos

Obtención de ADN de tenias. El ADN utilizado para la valoración de todas las reacciones de LAMP ensayadas fue ADN genómico de gusanos adultos de *T. solium*, *T. saginata*, *T. asiatica* y *T. hydatigena* suministrado por el Servicio de Parasitología del ISCIII. En el laboratorio, el ADN se cuantificó utilizando un Nanodrop (ND-1000) y las concentraciones iniciales obtenidas (8 ng/μL, 9,8 ng/μL, 240 ng/μL y 10,8 ng/μL respectivamente) se diluyeron en agua ultrapura a concentraciones

finales de 2 ng/μL para *T. solium* y 2,4 ng/μL para *T. saginata* y *T. asiatica*. Se realizaron diluciones seriadas desde $1 \cdot 10^{-1}$ hasta $1 \cdot 10^{-9}$ ng/μL: para *T. solium* y *T. saginata*, a partir de 1 ng/μL; para *T. asiatica* se diluyó desde el stock original (240 ng/μL) hasta 50 ng/μL y desde esta concentración se realizaron las diluciones seriadas 1:10, alcanzando una concentración final de $5 \cdot 10^{-9}$ ng/μL. Las distintas concentraciones de ADN de las tenias se mantuvieron a -20°C hasta su uso, utilizándose como control positivo en las distintas reacciones de LAMP y para evaluar la **sensibilidad** de la técnica.

Obtención de ADN de otros parásitos. Para evaluar la **especificidad** del LAMP, se utilizaron un total de 19 muestras de ADN, incluyendo ADN de cestodos (*Taenia solium*, *T. saginata*, *T. asiatica*, *T. hydatigena* e *Hymenolepis diminuta*), trematodos (*Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. bovis*, *Echinostoma caproni*, *Fasciola hepatica* y *Dicrocoelium dendriticum*), nematodos (*Strongyloides venezuelensis*, *Anisakis simplex* y *Trichinella spiralis*) y protozoos intestinales (*Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* y *Entamoeba histolytica*) disponibles en el CIETUS. La concentración del ADN de los distintos parásitos se midió en el *Nanodrop* (ND-1000) y se diluyó en agua ultrapura hasta una concentración final de 0,5 ng/μL. Las diluciones se conservaron a -20°C hasta el momento en que se utilizaron en la mezcla de reacción.

3.3. Valoración, puesta a punto y optimización del LAMP para la amplificación de ADN de *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica*

Valoración y puesta a punto. Para poder llevar a cabo la valoración inicial y comprobar el funcionamiento de los métodos LAMP para la amplificación de las distintas especies de tenias, se utilizaron los componentes y condiciones descritas inicialmente para cada una de las reacciones, utilizando en cada caso el juego de cebadores específico; la composición de las mezclas de reacción se recogen en la Tabla 3. Las reacciones se incubaron en un termobloque *K Dry-Bath*® (No. DB-006) durante 60 minutos a 63°C, más 5 minutos adicionales a 80°C para detener la reacción por inactivación de la enzima. El *buffer* de reacción, la enzima *Bst* ADN polimerasa y el MgSO_4 fueron suministrados por *New England Biolabs*; la betaína por *SIGMA-ALDRICH*®.

Tabla 3. Composición de la mezcla de reacción descrita por Nkouawa *et al.* (2009) para la amplificación de tenias. Los cebadores FIP, BIP, F3 y B3 son específicos para cada especie.

Componentes	Concentración	Volumen
H ₂ O		9,7 µL
Betaína	0,8 M	4 µL
MgSO ₄	8 mM	1,5 µL
<i>ThermoPol Reaction Buffer</i> ^a		2,5 µL
dNTPs	0,1 mM	3,5 µL
FIP	1,6 mM	0,4 µL
BIP	1,6 mM	0,4 µL
F3	0,2 mM	0,5 µL
B3	0,2 mM	0,5 µL
<i>Bst</i> ADN Polimerasa <i>Large Fragment</i>	0,32 U/µL	1,0 µL
ADN molde	2,0-2,4-2,4 µL	1,0 µL
TOTAL		25 µL

^a*ThermoPol Reaction Buffer*: 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton® X-100, pH 8.8, 25 °C.

Optimización del método LAMP para tenias. Se ensayaron hasta seis posibles mezclas de reacción diferentes para realizar el método LAMP para cada una de las tres especies de tenias, utilizando sus cebadores específicos. Las variaciones incluyeron el uso de distintas enzimas (*Bst* ADN polimerasa *Large Fragment*, *Bst* ADN polimerasa 2.0 *WarmStart*), distintos *buffers* de reacción y distintas concentraciones de betaína (0,8 M – 1 M). La concentración de MgSO₄ no se modificó en ninguno de los ensayos realizados respecto a la concentración inicial descrita en la bibliografía. Todas las mezclas de reacción fueron preparadas individualmente para cada especie de tenia y sometidas a las mismas condiciones de temperatura y tiempo que la reacción inicial. Las distintas combinaciones de las seis mezclas de reacción se recogen en la Tabla 4, señalando en color rojo las variaciones respecto a la mezcla de reacción inicial (ensayo 1).

Tabla 4. Componentes utilizados en las seis mezclas de reacción ensayadas para la optimización de la reacción de LAMP para tenias. Se indican en rojo los reactivos modificados en cada prueba con respecto a la mezcla original (ensayo 1) descrita por Nkouawa *et al.* (2009).

	Buffer de reacción	Concentración de Betaína	<i>Bst</i> ADN polimerasa
ENSAYO 1 (Nkouawa <i>et al.</i> , 2009)	<i>ThermoPol Reaction Buffer</i>	0,8 M	<i>Large Fragment</i>
ENSAYO 2	<i>Isothermal Amplification Buffer</i> ^a	0,8 M	<i>Large Fragment</i>
ENSAYO 3	<i>ThermoPol Reaction Buffer</i>	1 M	<i>Large Fragment</i>
ENSAYO 4	<i>ThermoPol Reaction Buffer</i>	0,8 M	2.0 WarmStart
ENSAYO 5	<i>ThermoPol Reaction Buffer</i>	1 M	2.0 WarmStart
ENSAYO 6	<i>Isothermal Amplification Buffer</i>	0,8 M	2.0 WarmStart
ENSAYO 7	<i>Isothermal Amplification Buffer</i>	1 M	2.0 WarmStart

^a*Isothermal Amplification Buffer*: 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Tween® 20, pH 8.8, 25 °C.

3.4. Detección de los productos de amplificación

La detección de los productos de amplificación obtenidos por LAMP se realizó mediante: a) **turbidez**, debida al acúmulo de pirofosfato de magnesio (subproducto de la reacción) que produce un precipitado blanco en las muestras positivas; b) **colorimétricamente**, por la adición a los tubos de reacción de 2 μ L (1:10; 10.000X) del colorante fluorescente *SYBR Green I* (Invitrogen™). En las reacciones positivas se observó el cambio de color, de naranja a verde fluorescente, mientras que en las negativas se mantuvo el color naranja original del colorante; y c) **electroforesis en gel de agarosa** al 2% (70 mL de TBE 0,5X, 1,4 g de agarosa) teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados bajo luz ultravioleta. Tanto los tubos coloreados como los geles se fotografiaron y las fotografías se almacenaron en soporte informático para su posterior manejo y edición.

3.5. Búsqueda de secuencias nucleotídicas para la detección específica mediante LAMP de *Taenia hydatigena*. Diseño y selección de cebadores

Para la búsqueda y selección de secuencias específicas de *T. hydatigena* se utilizó en primer lugar la base de datos de *Genbank* (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) para localizar las posibles secuencias disponibles de esta especie. En esta búsqueda se encontraron 445 resultados pertenecientes a 20 genes diferentes del parásito. Con estas secuencias se realizó un alineamiento BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para descartar posibles coincidencias con secuencias de otras especies de la clase *Cestoda* y mamíferos, y lograr así una mayor especificidad. Se seleccionaron dos secuencias únicas para *T. hydatigena* y se obtuvo el archivo FASTA de cada una, para la posterior edición de las mismas. Ambas se utilizaron para el diseño de cebadores específicos mediante el *software Primer Explorer v4* (Eiken Chemical Co., Ltd., Japan; <http://primerexplorer.jp/e/>). Tanto el diseño como la posterior selección de los cebadores se llevaron a cabo siguiendo los criterios descritos en “A guide to LAMP primer designing” (http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/index.html). Para cada secuencia estudiada, el *software* generó cinco posibles juegos de cuatro cebadores cada uno; finalmente, se seleccionó un juego de cuatro cebadores para cada secuencia, cada uno compuesto por los cebadores F3, B3, FIP (F1c+F2) y BIP (B1c+B2). Las secuencias completas de los genes se editaron con el programa *Bioedit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) para comprobar de nuevo que los fragmentos amplificados por los cebadores externos F3 y B3 de cada secuencia mantenían su especificidad. Posteriormente, y para corroborar aún más la especificidad de los fragmentos seleccionados, éstos se compararon con los genomas de otros parásitos disponibles en las bases de datos del *Sanger Institute* (www.sanger.ac.uk).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Valoración, puesta a punto y optimización de las mezclas de reacción de los métodos LAMP descritos para la detección de *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica*

Valoración del LAMP descrito por Nkouawa *et al.* (2009). Los resultados de la amplificación inicial por LAMP de las distintas especies de tenias utilizando la composición de la mezcla de reacción descrita por Nkouawa *et al.* (2009) se muestran en la Figura 8. Como puede observarse, no se consigue una óptima amplificación de *T. solium* y las obtenidas para *T. saginata* y *T. asiatica* no resultaron repetitivas de forma general al realizar distintos ensayos de amplificación. Estos problemas, detectados inicialmente en su puesta a punto en las instalaciones del Servicio de Parasitología del ISCIII, son los que se trataron de solventar en el presente trabajo. Para ello se realizaron las modificaciones oportunas de los componentes de la reacción y su posterior valoración.

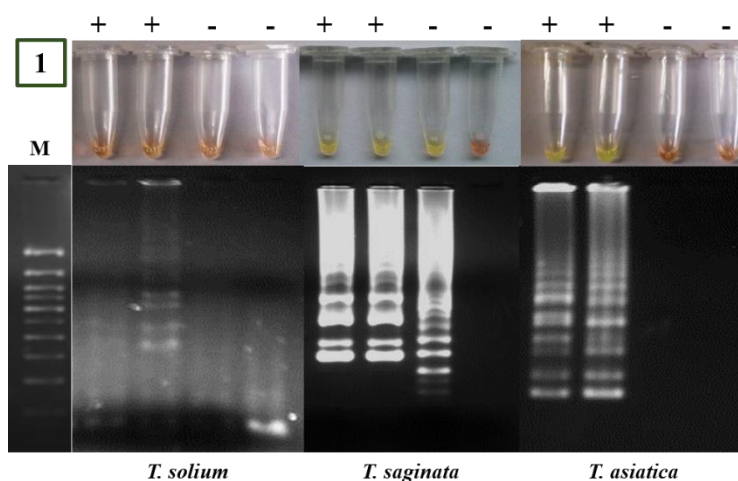


Figura 8. Amplificación de *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica* utilizando la mezcla de reacción descrita por Nkouawa *et al.*, (2009). Arriba, visualización mediante colorimetría por adición de *SYBR Green I*; “+”, controles positivos (con ADN de cada tenia); “-”, controles negativos (no ADN). Abajo, electroforesis en gel de agarosa; “M”, marcador de peso molecular XIII (Roche).

Puesta a punto y optimización. Teniendo en cuenta la bibliografía consultada y la experiencia previa del CIETUS en la elaboración de ensayos LAMP, se valoraron como posibles cambios para la optimización de la reacción la concentración de betaína, la enzima utilizada y el *buffer* de reacción, manteniendo constante la concentración de MgSO_4 . Se utilizaron con cada mezcla los cebadores específicos de cada especie. Las distintas combinaciones y los resultados obtenidos en la amplificación por LAMP utilizando las distintas mezclas de reacción se presentan en la Tabla 5 y en la Figura 9.

Tabla 5. Amplificación de ADN de *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica* con las diferentes mezclas de reacción. Están marcados en rojo los componentes modificados con respecto a la mezcla de reacción original; “+”, amplificación; “-”, no amplificación; “*ThermoPol*”: *ThermoPol Reaction Buffer*; “*Isothermal Amp.*”: *Isothermal Amplification Buffer*; “*Bet.*”: betaína; “*Bst pol. LF*”: *Bst DNA polimerasa Large Fragment*; “*Bst pol. WS*”: *Bst DNA polimerasa 2.0 WarmStart*.

ENSAYO (componentes de la mezcla)	<i>T. solium</i>	<i>T. saginata</i>	<i>T. asiatica</i>
1 (<i>ThermoPol</i> +0,8M <i>Bet.</i> + <i>Bst Pol. LF</i>)	+/-	+	+
2 (<i>Isothermal Amp.</i> +0,8M <i>Bet.</i> + <i>Bst Pol. LF</i>)	-	-	-
3 (<i>ThermoPol</i> + 1M <i>Bet.</i> + <i>Bst Pol. LF</i>)	-	+	+
4 (<i>ThermoPol</i> +0,8M <i>Bet.</i> + <i>Bst Pol. WS</i>)	+	+	+
5 (<i>ThermoPol</i> + 1M <i>Bet.</i> + <i>Bst Pol. WS</i>)	-	+	+
6 (<i>Isothermal Amp.</i> +0,8M <i>Bet.</i> + <i>Bst Pol. WS</i>)	+	+	+
7 (<i>Isothermal Amp.</i> + 1M <i>Bet.</i> + <i>Bst Pol. WS</i>)	+	-	+

La primera modificación en la mezcla de reacción (ensayo 2) respecto a la descrita inicialmente (Tabla 5; ensayo 2) consistió únicamente en la variación del *buffer* de reacción recomendado por la casa comercial para el funcionamiento de la enzima *Bst* ADN polimerasa *Large Fragment* por el *buffer Isothermal Amplification Buffer*, optimizado para su uso con las enzimas *Bst* ADN polimerasa 2.0 y *WarmStart*. No se obtuvo amplificación en ninguna de las reacciones de LAMP para las distintas tenias (Figura 9.2), indicando así la importancia de la composición del *buffer* apropiado para el funcionamiento de la enzima para la que está optimizado.

En el ensayo 3 se varió la concentración de betaína respecto a la mezcla de reacción original (Tabla 5; ensayo 3). La betaína (trimetilglicina) es un componente habitual de las reacciones tipo LAMP. En concentraciones entre 0,8 y 1,6 M mejora el rendimiento de la amplificación de ADN por reducir las estructuras secundarias que se forman en las zonas ricas en GC y que impiden el acceso a la hebra de ADN de la polimerasa. De este modo aumenta la especificidad de la reacción al eliminar la dependencia de la amplificación de la composición GC durante la desnaturalización del ADN. Altas concentraciones provocan el efecto contrario: no permiten la unión de la enzima a la cadena de ADN al impedir todo tipo de estructuras secundarias, necesarias para el anillamiento (*SIGMA-ALDRICH*®, 2016; <http://www.sigmaaldrich.com>). Se aumentó la concentración de betaína respecto a la concentración inicial de partida (1 M vs. 0,8 M) teniendo en cuenta que trabajos previos en el laboratorio habían demostrado que una concentración de betaína 0,8–1 M era la que proporcionaba una mejor amplificación al ensayar un rango de concentraciones (0,8; 1; 1,2; 1,4; 1,6 M) en la puesta a punto de ensayos tipo LAMP (Fernández-Soto *et al.*, 2014a; Gandasegui *et al.*, 2015). En este caso se consiguió la amplificación del ADN de *T. saginata* y *T. asiatica*, pero no de *T. solium* (Figura 9.3).

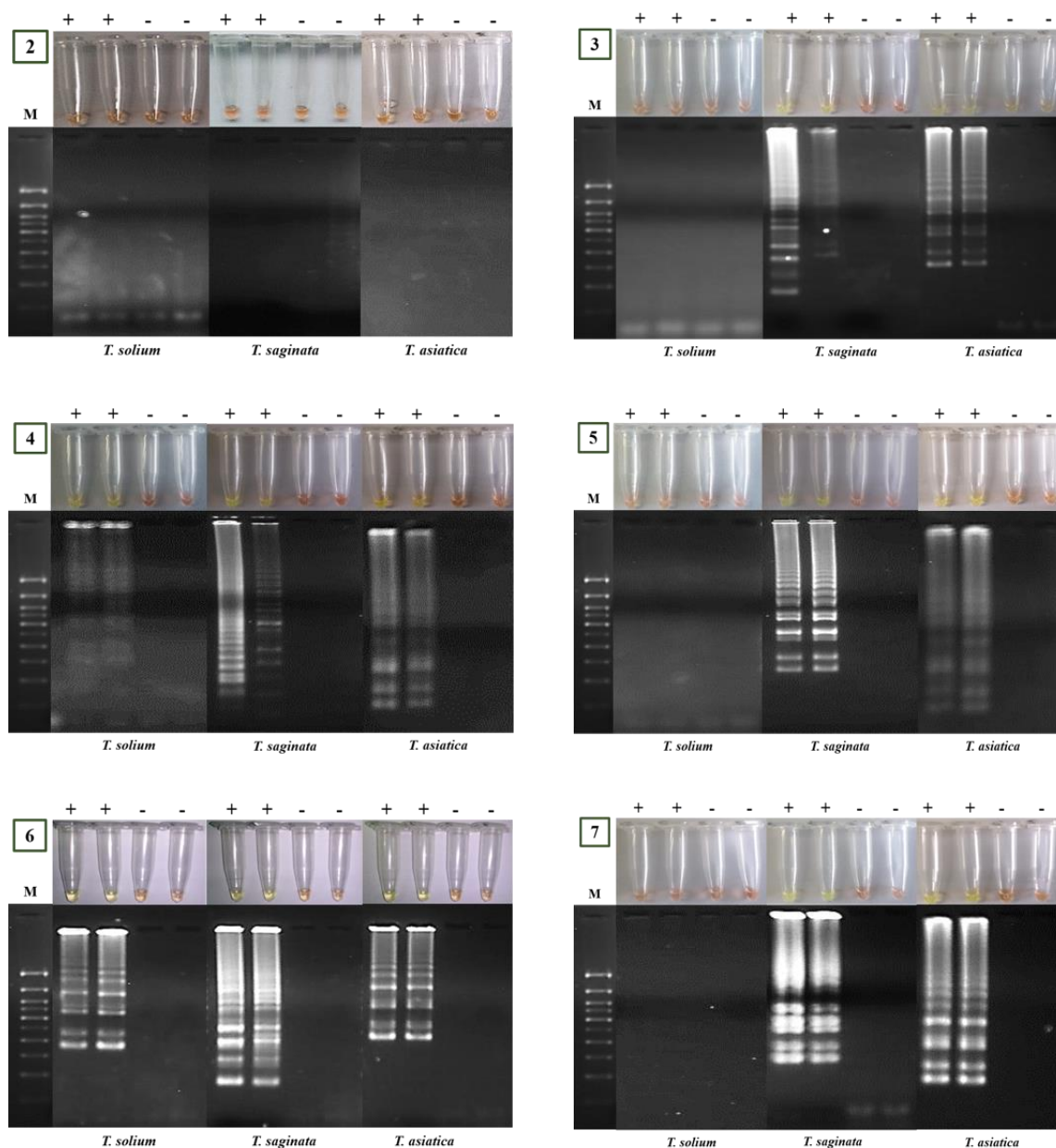


Figura 9. Amplificación mediante LAMP de *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica* utilizando variaciones en la mezcla de reacción. Los ensayos están numerados según la descripción previa (Tabla 5). Arriba, visualización mediante colorimetría por adición de *SYBR Green I*; “+”, controles positivos (ADN de cada tenia); “-”, controles negativos (no ADN). Abajo, electroforesis en gel de agarosa; “M”, marcador de peso molecular XIII (Roche).

En el ensayo 4 variamos la enzima utilizada en la reacción respecto a la utilizada por Nkouawa *et al.* (2009), esto es, *Bst* ADN polimerasa 2.0 *WarmStart* en lugar de *Bst* ADN polimerasa *Large Fragment* (Tabla 5; ensayo 4). En este caso, y aunque el cambio de color de la mezcla de reacción indicaba una amplificación positiva para todas las tenias, el patrón de bandas en el gel de agarosa indicaba una menor cantidad de ADN obtenido en el caso de *T. asiatica* y *T. solium* respecto a *T. saginata* (Figura 9.4). La enzima *Bst* ADN polimerasa 2.0 *WarmStart* es una enzima diseñada *in silico* con objeto de mejorar sus propiedades de amplificación: mayor velocidad de amplificación y rendimiento, mayor tolerancia a las sales, un mayor rango de temperatura óptima de amplificación,

mejor termoestabilidad (60-65°C) y una mejor incorporación de dUTP a las reacciones. Además, presenta un aptámero de unión reversible que inhibe la actividad polimerasa por debajo de los 45°C, lo que permite su uso durante más tiempo a temperatura ambiente (New England Biolabs, 2016; <https://www.neb.com/>). A pesar de todas estas características mejoradas respecto a la *Bst* ADN polimerasa *Large Fragment*, no se consiguió una buena amplificación con *T. asiatica* ni con *T. solium*, presumiblemente debido al uso del *buffer ThermoPol Reaction Buffer*, que no está optimizado para el mejor rendimiento de la enzima.

En el ensayo 5 se varían simultáneamente dos componentes de la mezcla de reacción: la concentración de betaína (1 M vs. 0,8 M) y la enzima *Bst* ADN polimerasa 2.0 *WarmStart* manteniendo el *buffer ThermoPol Reaction Buffer* (Tabla 5; ensayo 5). Obtuvimos una buena amplificación de *T. saginata* (elevada cantidad de ADN en gel de agarosa); sin embargo, los resultados de amplificación de *T. asiatica* y *T. solium* fueron los mismos que los obtenidos en el ensayo anterior, corroborando que el funcionamiento de la enzima *Bst* ADN polimerasa 2.0 *WarmStart* no es el adecuado cuando no se utiliza con su *buffer* de reacción (Figura 9.5).

En el ensayo 6 también se variaron simultáneamente dos componentes de la reacción respecto a la inicial descrita: el *buffer* (*Isothermal Amplification Buffer* vs. *ThermoPol Reaction Buffer*) y la enzima (*Bst* ADN polimerasa 2.0 *WarmStart* vs. *Bst* ADN polimerasa *Large Fragment*) (Tabla 5; ensayo 6). En este caso tanto el resultado visual colorimétrico como el obtenido en el gel de agarosa indicaron una clara amplificación del ADN de las tres especies de tenia, con un rendimiento en la amplificación muy superior en todas las especies respecto a los ensayos anteriores (Figura 9.6). Así pues, el rendimiento de la enzima en la amplificación del ADN es más elevado cuando se utiliza con su *buffer* específico, que permite alcanzar su rendimiento óptimo.

El aumento de concentración en la betaína (1 M vs. 0,8 M) realizado en el ensayo 7 con respecto a la prueba anterior (Tabla 5; ensayo 7) permitió obtener una amplificación similar en el caso de *T. saginata* y *T. asiatica*, sin embargo, no se obtuvo amplificación alguna en el caso de *T. solium* (Figura 9.7).

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados de amplificación obtenidos en los distintos ensayos realizados, la mezcla de reacción utilizada en el ensayo 6, que incluía la enzima *Bst* ADN polimerasa 2.0 *WarmStart*, el *buffer* de reacción *Isothermal Amplification Buffer* y una concentración de betaína de 0,8 M, resultó ser la mezcla óptima para la amplificación de las tres especies de tenias, y se seleccionó como la mezcla idónea para la realización de las siguientes pruebas de especificidad y sensibilidad del LAMP.

4.2. Valoración de la especificidad de los distintos métodos LAMP

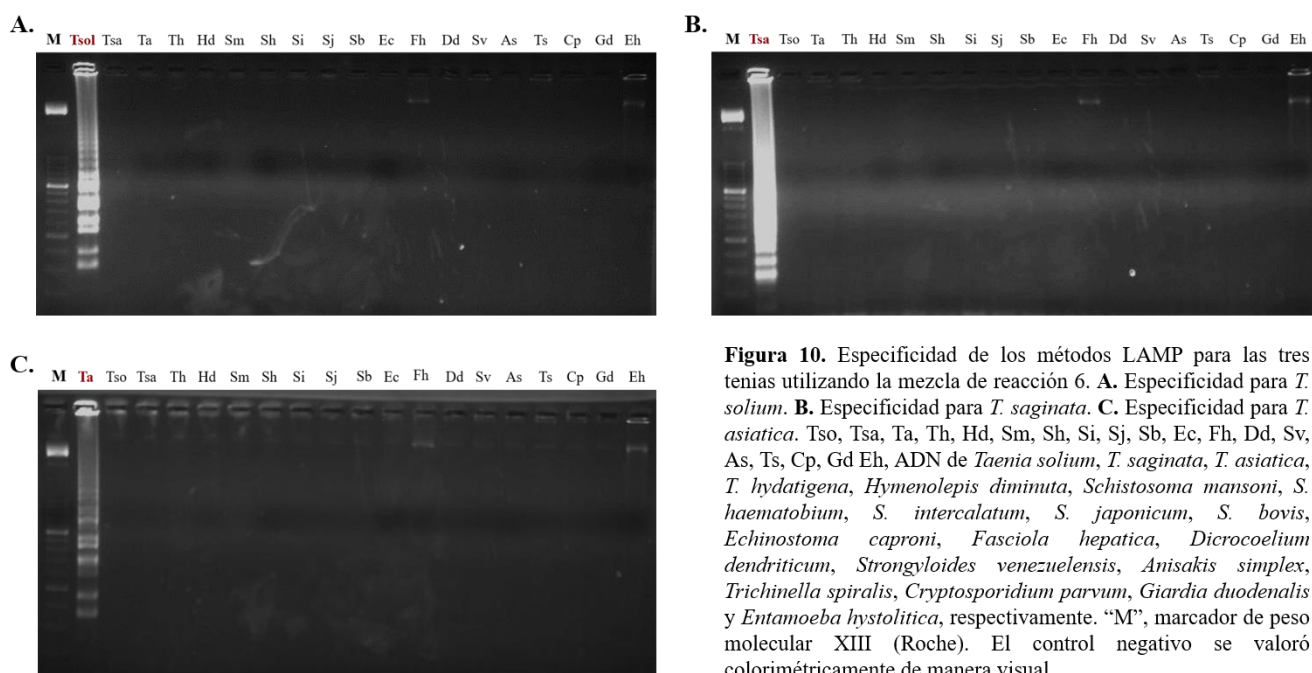


Figura 10. Especificidad de los métodos LAMP para las tres tenias utilizando la mezcla de reacción 6. **A.** Especificidad para *T. solium*. **B.** Especificidad para *T. saginata*. **C.** Especificidad para *T. asiatica*. Tso, Tsa, Ta, Th, Hd, Sm, Sh, Si, Sj, Sb, Ec, Fh, Dd, Sv, As, Ts, Cp, Gd Eh, ADN de *Taenia solium*, *T. saginata*, *T. asiatica*, *T. hydatigena*, *Hymenolepis diminuta*, *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. bovis*, *Echinostoma caproni*, *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Strongyloides venezuelensis*, *Anisakis simplex*, *Trichinella spiralis*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* y *Entamoeba histolytica*, respectivamente. “M”, marcador de peso molecular XIII (Roche). El control negativo se valoró colorimétricamente de manera visual.

En la Figura 10 se muestra el resultado obtenido en las pruebas de especificidad. Se observa que la mezcla de reacción número 6 seleccionada, al ser utilizada en combinación con los cebadores específicos para cada especie de tenia, amplifica exclusivamente el ADN de *T. solium*, *T. saginata* o *T. asiatica*, respectivamente. Además, en ningún caso se obtuvo amplificación del ADN de los otros parásitos incluidos en la prueba, ni siquiera de aquellos que pueden detectarse también en heces (como *H. diminuta*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *F. hepatica*, *C. parvum*, *G. duodenalis* o *E. histolytica*). Nuestros resultados sobre la especificidad del LAMP optimizado respecto al inicialmente descrito por Nkouawa *et al.* (2009), han sido claramente ampliados, teniendo en cuenta que los autores citados solamente comprobaron la especificidad entre tenias y no frente a otros posibles parásitos que pueden presentar reacciones cruzadas al encontrarse potencialmente en las muestras de heces utilizadas en el diagnóstico.

4.3. Valoración de la sensibilidad de los distintos métodos LAMP

En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de sensibilidad del método LAMP para las tres especies de tenia. Como puede observarse, el límite de detección alcanzado para *Taenia solium* y *T. saginata* fue de 0,002 ng/μL, mientras que para *T. asiatica* fue de 0,01 ng/μL. Todos los resultados colorimétricos (verde: positivos y naranja: negativos) se correspondieron a los obtenidos al resolver los productos de la amplificación por electroforesis en geles de agarosa.

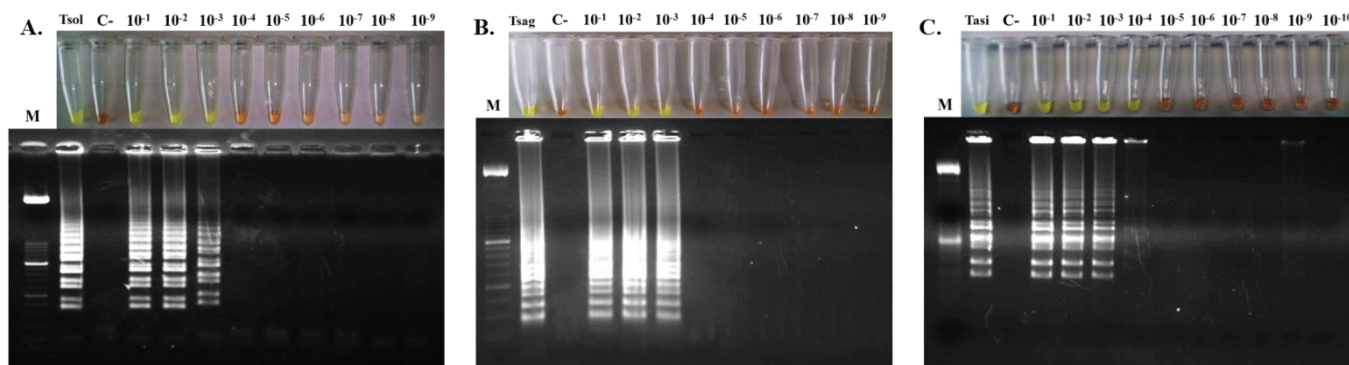


Figura 11. Sensibilidad de los métodos LAMP para las tres tenias utilizando la mezcla de reacción 6. **A.** Límite de detección *T. solium*-LAMP: 0,002 ng/μL (2 pg/μL). Tsol, ADN de *T. solium* (2 ng/μL); C-, control negativo (no ADN); 10^{-1} a 10^{-9} , diluciones seriadas. **B.** Límite de detección *T. saginata*-LAMP: 0,002 ng/μL (2 pg/μL). Tsag, ADN de *T. saginata* (2 ng/μL); C-, control negativo (no ADN); 10^{-1} a 10^{-9} , diluciones seriadas. **C.** Límite de detección *T. asiatica*-LAMP: 0,02 ng/μL (10 pg/μL). Tasi, ADN de *T. asiatica* (100 ng/μL); C-, control negativo (no ADN); 10^{-1} a 10^{-10} , diluciones seriadas. “M”, marcador de peso molecular XIII (Roche).

No podemos comparar los límites de detección de ADN obtenidos para las tres especies de tenia con los descritos previamente en el trabajo de Nkouawa *et al.* (2009), ya que en dicho trabajo los autores refieren los valores de sensibilidad obtenidos en función de la concentración de plásmidos específicos diseñados para la detección de la diana de amplificación de las tenias. En nuestro trabajo hemos utilizado ADN genómico obtenido directamente de los parásitos, por lo que no podemos realizar una comparación de la sensibilidad en la detección. Aunque los citados autores también valoran la sensibilidad determinando la cantidad mínima de huevos de tenia por gramo de heces necesaria para lograr la detección mediante LAMP, no indican la concentración de ADN, por lo que tampoco es posible la comparación de los resultados obtenidos en nuestro trabajo. No obstante, los valores de sensibilidad obtenidos para las distintas especies de tenias están en el rango de lo descrito previamente para otros métodos LAMP desarrollados para otros parásitos por nuestro grupo de investigación (Fernández-Soto *et al.*, 2014a). Respecto a las tenias, no existen otros métodos LAMP descritos con los que podamos comparar nuestros valores de sensibilidad; existen algunos trabajos de amplificación molecular mediante PCR que utilizan el gen *cox1* o el gen *12S* de *T. saginata* que alcanzan valores de 1 pg/μL y 100 fg/μL, respectivamente (Roelfsema *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta los valores de elevada sensibilidad alcanzados con la PCR, es posible que en un futuro, utilizando un LAMP diseñado sobre la secuencia del gen *12S*, se aumente considerablemente la sensibilidad en la detección. Sin embargo, este gen parece estar muy conservado en todas las especies de tenias, y por lo tanto no permitiría la realización de un método LAMP específico para cada una de las tres especies de interés en clínica humana, aunque sí uno sistémico para la detección de cualquier infección producida por tenias.

En un trabajo previo desarrollado en el CIETUS para el diseño de un método LAMP para la detección específica de *Loa loa* (Fernández-Soto *et al.*, 2014b), se logró alcanzar un límite de

detección de 50 fg/ μ L de ADN genómico del parásito. La diana sobre la que se diseñaron los cebadores era una región de ADN repetitivo del genoma. Los límites de detección que se alcanzan al basar la técnica en estas regiones diana son mayores, obviamente por la existencia de más copias en el genoma. En este sentido, y en relación con las especies de tenias utilizadas en este trabajo, en la actualidad se está desarrollando una PCR a tiempo real en el Servicio de Parasitología del ISCIII (Madrid) – con quienes colaboramos en el presente trabajo – para la detección de ADN de tenias utilizando como dianas regiones repetitivas del genoma. Los resultados preliminares obtenidos apuntan a un límite de detección del orden de 10^{-6} ng/ μ L. Teniendo esto en cuenta, nuevos métodos LAMP para la detección específica de tenias basados en secuencias repetitivas de sus genomas podrán mejorar potencialmente los resultados de sensibilidad obtenidos hasta el momento.

4.4. Diseño y selección de cebadores específicos para la amplificación mediante LAMP de *Taenia hydatigena*.

La parte crítica y fundamental para el funcionamiento de un método LAMP es la búsqueda y selección de secuencias diana específicas en el ADN y el diseño de cebadores específicos para su amplificación. Tras la búsqueda y el estudio de alineamiento de secuencias, se seleccionaron dos posibles que no presentaban coincidencias con otros parásitos ni con mamíferos. La primera secuencia pertenece al gen del citocromo b, de 1068 pares de bases (pb) (*Taenia hydatigena isolate Xichang 10 cytochrome b (cytb) gen, complete cds, mitochondrial; GenBank JF720954.1*) (Hao *et al.*, 2011). La segunda secuencia seleccionada, de 515 pb, pertenece a la subunidad 6 de la ATPasa (*Taenia hydatigena mitochondrial DNA, ATPase subunit 6, GenBank: AB031286.1*) (Nakao *et al.*, 2001). De cada secuencia se seleccionó uno de los juegos de cebadores generados por el *software* que cumplía los requisitos para ser un juego adecuado para la amplificación. Finalmente, se seleccionó el juego diseñado sobre el gen mitocondrial del citocromo b (*cytb*), por presentar mejores características para la amplificación. El criterio de selección se basó en las indicaciones descritas en el manual que la propia empresa facilita para el diseño de cebadores. El juego seleccionado está compuesto por cuatro cebadores: F3, B3, FIP (F1c+F2) y BIP (B1c+B2). En ninguno de los juegos se generó *loop primer*. Las secuencias de los cebadores están recogidas en la Tabla 6. En la Figura 12 se muestra su posición respecto a la secuencia diana.

Tabla 6. Características y secuencias nucleotídicas del juego de cebadores seleccionado a partir de la secuencia de 1068 pb del citocromo b de *T. hydatigena* (GenBank: JF720954.1) para la amplificación mediante la técnica LAMP de ADN del parásito.

Primers LAMP- <i>T. hydatigena</i> ID: 23 dimer (mínimum)dG=-2,36								
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	697	718	22	55,16	-4,28	-5,35	0,32	TTTGGTTGTTTGTAGTCCTG
B3	904	923	20	57,35	-7,18	-4,13	0,45	CGCCACACATTGTATACACT
FIP			49					CGGCTTTATAGAACTGGCGTATTT- ATATTTTAGTGGATATAGAGGCGT
BIP			48					ACGTTGCATAAGATCAAAGATTGGG- CCATTACTAGTAGGAATTCACAA
F2	719	742	24	56,84	-2,28	-6,91	0,33	ATATTTTAGTGGATATAGAGGCGT
F1c	762	786	25	61,58	-6,52	-2,89	0,40	CGGCTTTATAGAACTGGCGTATTT
B2	877	899	23	55,25	-3,74	-4,58	0,35	CCATTACTAGTAGGAATTCACAA
B1c	819	843	25	61,84	-5,49	-5,00	0,40	ACGTTGCATAAGATCAAAGATTGGG

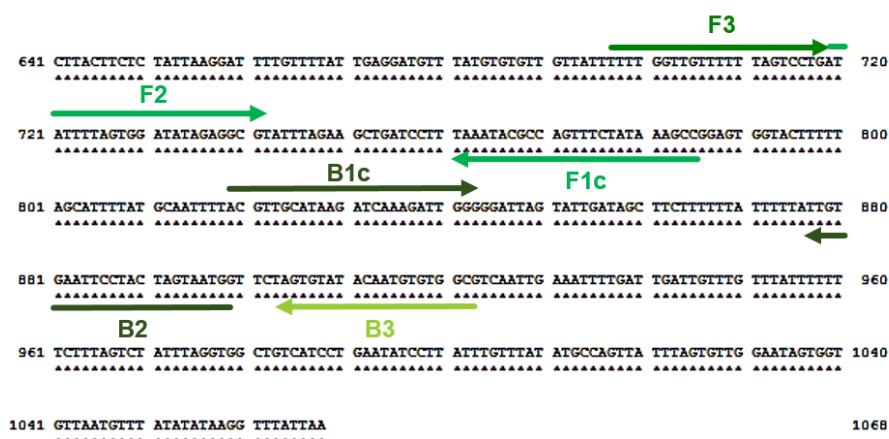


Figura 12. Posición de los cebadores diseñados sobre el fragmento final (427 pb) de la secuencia del gen del citocromo b de *T. hydatigena*. Las flechas indican la dirección de la extensión. F3 es el cebador externo *forward*; B3 el cebador externo *reverse*; FIP el cebador interno *forward* (formado por la unión de las secuencias F1c y F2); y BIP el cebador interno *reverse* (formado por las secuencias B1c y B2). La secuencia procede de GenBank (JF720954.1).

Existen varias razones por las que este juego de cebadores puede considerarse válido para la amplificación mediante LAMP con respecto al resto de los generados. En primer lugar, es necesario comprobar la temperatura de *melting* (T_m), es decir, la temperatura óptima a la que anilla cada cebador, por el método de *Nearest-Neighbor*, con el que se obtiene el valor aproximado más cercano al real. En el cálculo se contemplan las condiciones experimentales (concentración de sales, de cebadores, etc.) por lo que se establecen unas condiciones predeterminadas. Bajo dichas condiciones, la T_m debería alcanzar valores de entre 64 y 66 °C para F1c y B1c, y entre 59-1 °C para F2, B2, F3 y B3. En el caso del juego de cebadores elegido, las temperaturas son muy próximas a las citadas como referencia (ver Tabla 6). Para el resto de los juegos obtenidos, los valores resultaron mucho más bajos. No sólo la T_m influye durante el anillamiento, sino también la enzima y su temperatura de actividad óptima, por lo que este requisito no es excesivamente limitante siempre que los valores de T_m no se distancien en exceso de los establecidos.

Por otro lado, debemos fijarnos en la estabilidad de las posiciones de inicio de la replicación genética por los cebadores. Las posiciones que debemos comprobar son: el extremo 3' de la región F2; el extremo 5' de la región F1c; el extremo 3' de la región B2; y el extremo 5' de la región B1c. La estabilidad viene determinada por el valor de la energía libre de Gibbs (ΔG) en dichas posiciones. De forma específica, la estabilidad se manifiesta en un valor de ΔG igual o menor a $-4,0$ kcal/mol. Cuanto más negativo sea este valor, mayor será la probabilidad de anillamiento. Así, los cebadores que no cumplan estas condiciones serán eliminados por su posible inestabilidad. En el caso del juego de cebadores seleccionado, los cuatro cebadores presentan valores muy por debajo del límite en sus respectivos extremos, por lo que cumplen la condición inicial para conformar un juego de cebadores válido (ver Tabla 6). Todos los juegos analizados cumplieron esta condición, sin embargo, el juego de cebadores finalmente seleccionado presentó los valores más negativos y, por tanto, teóricamente más estables.

Otro parámetro a considerar es el contenido en GC de los cebadores. Lo ideal es que este valor se encuentre en torno al 50%, aunque un valor desde un 40% es aceptable. Los cebadores del juego seleccionado estaban en el límite de este valor (algunos incluso por debajo), lo que podría indicar que los cebadores no amplificarán convenientemente, pero tampoco este valor tampoco es determinante porque de nuevo habría que considerar adicionalmente tanto la actividad de la polimerasa como la concentración de betaína. Además, el propio *software* diseña *in silico* los cebadores de modo que no formen estructuras secundarias para no interferir en la amplificación. Para prevenir la dimerización de los cebadores también es importante que los extremos 3' no sean complementarios, hecho que tampoco ha sucedido.

Por último, los cebadores deben estar diseñados de modo que la distancia entre el extremo final de F2 y el extremo final de B2 sea de entre 120-160 pb. En nuestro caso, la distancia resultó ser de 157 pb. También influyen las distancias entre los extremos 5' de F2 y F1 (fragmento que forma el bucle durante la amplificación) y entre F2 y F3. Estas distancias no deben superar nunca las 60 pb. Nuestro juego de cebadores cumple también el requisito, al presentar en este caso unas distancias de 43 pb y 22 pb, respectivamente.

Todas estas razones señaladas justifican la elección final de este juego de cebadores para la teórica amplificación mediante un método LAMP de la secuencia específica de 427 pb correspondiente al gen del citocromo b (*cytb*) de *T. hydatigena*. Este juego de cebadores se utilizará para la puesta a punto experimental del método LAMP en el laboratorio.

Finalmente, es preciso indicar que durante la realización del presente trabajo los resultados obtenidos fueron presentados en forma de comunicaciones orales en el 1^{er} Congreso Internacional del grupo *CYSTINET* sobre teniasis y cisticercosis celebrado en Belgrado (Serbia) durante los días 3 y 4 de noviembre de 2015; también en el *Stakeholder Meeting on T. solium Taeniasis/Cysticercosis Diagnostic Tools* organizado por la OMS y celebrado en Ginebra (Suiza) durante los días 17 y 18 de diciembre de 2015. Los resúmenes de las dos ponencias se incluyen en el epígrafe 7.2 del apartado “7. ANEXOS”.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha puesto a punto en el laboratorio el método LAMP descrito inicialmente por Nkouawa *et al.* (2009) para la amplificación específica de *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica*. La optimización de la mezcla de reacción ha permitido la estandarización de la técnica para su posible aplicación en otros laboratorios.
2. Se ha determinado la sensibilidad del método LAMP utilizando ADN genómico de las distintas especies de tenia y se han corroborado y ampliado los resultados conocidos de su especificidad al incluir en el estudio un mayor número de especies de otros parásitos.
3. Por primera vez se ha diseñado y seleccionado *in silico* un juego de cuatro cebadores que cumplen las características teóricas ideales para su utilización en la amplificación específica mediante LAMP de ADN de *T. hydatigena*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ai, L.; Li, C.; Elsheikha, H.M.; Hong, S.J.; Chen, J.X.; Chen, S.H.; Li, X.; Cai, X.Q.; Chen, M.X.; Zhu, X.Q. Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Veterinary Parasitology* 2010; 174 (3-4). pp. 228-233.
- Ale, A.; Bjorn, V.; Praet, N.; Gabriël, S.; Speybroeck, N.; Dorny, P.; Devleesschauwer, B. Epidemiology and genetic diversity of *Taenia asiatica*: a systematic review. *Parasites and Vectors* 2014; 7 (45).
- Anantaphruti, M.T. Current status of taeniasis in Thailand. *Korean Journal of Parasitology* 2013; 51 (1). pp. 37-42.
- Arai, S.; Tohya, M.; Yamada, R.; Osawa, R.; Nomoto, R.; Kawamura, Y.; Sekizaki, T. Development of loop-mediated isothermal amplification to detect *Streptococcus suis* and its application to retail pork meat in Japan. *International Journal of Food Microbiology* 2015; 28 (208). pp. 35-42.
- Bobes, R.J.; Frago, G.; Fleury, A.; García-Varela, M.; Sciutto, E.; Larralde, C.; Laclette, J.P. Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*. *Infection, Genetics and Evolution* 2014; 23. pp. 150-160.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC): *Cysticercosis*. Última revisión en Abril de 2014.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC): *Taeniasis*. Última revisión en Enero de 2013.
- Fernández-Soto, P.; Gandasegui Arahuetes, J.; Sánchez Hernández, A.; López Abán, J.; Vicente Santiago, B.; Muro A. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for early detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples: a diagnostic approach in a murine model. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014a; 8 (9). e3126.
- Fernández-Soto, P.; Mvoulouga, P.O.; Akue, J.P.; Abán, J.L.; Santiago, B.V.; Sánchez, M.C.; Muro, A. Development of a highly sensitive loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the detection of *Loa loa*. *PLoS ONE* 2014b; 9 (4). e94664.
- Gabriël, S.; Johansen, M.V.; Pozio, E.; Smit, G.S.A.; Devleesschauwer, B.; Allepuz, A.; Papadopoulos, E.; van der Giessen, J.; Dorny, P. Human migration and pig/pork import in the European Union: What are the implications for *Taenia solium* infections? *Veterinary Parasitology* 2015; 2013. pp. 38-45.
- Gandasegui, J.; Fernández-Soto, P.; Carranza-Rodríguez, C.; Pérez Arellano, J.L.; Vicente, B.; López-Abán, J.; Muro, A. The rapid-heat LAMP Pellet method: a potential diagnostic method for human urogenital schistosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015; 8 (9). e3126.
- García, H.H.; González, A.E.; Rodríguez, S.; Gonzálvez, G.; Llanos-Zavalaga, F.; Tsang, V.C.W.; Gilman, R.H. Epidemiología y control de la cisticercosis en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 2010; 27 (4).
- García, H.H.; Rodríguez, S.; Friedland, J.S. Immunology of *Taenia solium* taeniasis and human cysticercosis. *Parasite Immunology* 2014; 36. pp. 388-396.
- Han, E.T.; Watanabe, R.; Sattabongkot, J.; Khuntirat, B.; Sirichaisinthop, J.; Iriko, H.; Jin, L.; Takeo, S.; Tsuboi, T. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop mediated isothermal amplification for clinical diagnosis.

- Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45 (8). pp. 2521-2528.
- Hill, J.; Beriwal, S.; Chandra, I.; Paul, V.K.; Kapil, A.; Singh, T.; Wadowsky, R.M.; Singh, V.; Goyal, A.; Jahnukainen, T.; Johnson, J.R.; Tarr, P.I.; Vats, A. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Scherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46 (8). pp. 2800-2804.
- Hoberg, E.P. Phylogeny of *Taenia*: species definitions and origins of human parasites. *Parasitology International* 2006; 55. pp. 23-30.
- Hoberg, E.P. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes and Infection*. 2002; 4. pp. 859-866.
- Ito, A. Basic and applied problems in developmental biology and immunology of cestode infections: *Hymenolepis*, *Taenia* and *Echinococcus*. *Parasite Immunology* 2015; 37. pp. 53-69.
- Jia, W.Z.; Yan, H.B.; Guo, A.J.; Zhu, X.Q.; Wang, Y.C.; Shi, W.G.; Chen, H.T.; Zhan, F.; Zhan, S.H.; Fu, B.Q.; Littlewood, D.T.J.; Cai, X.P. Complete mitochondrial genomes of *Taenia multiceps*, *T. hydatigena* and *T. pisiformis*: additional molecular markers for a tapeworm genus of human and animal health significance. *BMC Genomics* 2010; 11 (447).
- Junquera, P. *Taenia* spp, cestodos (tenias) parásitos de perros y gatos: biología, prevención y control. *Parasitipedia.net*. Última revisión en Agosto de 2015.
- Junquera, P. *Cysticercus tenuicollis*, gusano cestodo parásito del ganado bovino, ovino, caprino y de caballos: biología, prevención y control. *Parasitipedia.net*. Última revisión en Junio de 2015.
- Kaneko, H.; Kawana, T.; Fukushima, E.; Suzutani, T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2007; 70 (3). pp. 499-501.
- Kuboki, N.; Inoue, N.; Sakurai, T.; Di Cello, F.; Grab, D.J.; Suzuki, H.; Sugimoto, C.; Igarashi, I. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41 (12). pp. 5517-5524.
- Mori, Y.; Kanda, H.; Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2013; 19. pp. 404-411.
- Mori, Y.; Naganmine, K.; Tomita, N.; Notomi, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 289 (1). pp. 150-154.
- Muro, A.; Andrade, M.A.; Shariati, F.; Pérez-Arellano, J.L. Infecciones por Cestodos. *Mecidine*. 2010; 10 (55). pp. 3707-3716.
- Njiru, Z.K. Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2012; 6. e1572.
- Njiru, Z.K.; Mikosza, A.S.; Armstrong, T.; Enyaru, J.C.; Ndung'u, J.M.; Thomson, A.R. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2008; 2 (2). e147.
- Nkouawa, A.; Sako, Y.; Nakao, M.; Nakaya, K.; Ito, A. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47 (1). pp. 168-174.
- Nkouawa, A.; Sako, Y.; Li, T.; Chen, X.; Wandra, T.; Swastika, I.K.; Nakao, M.; Yanagida, T.; Nakaya, K.; Qiu, D.; Ito, A. evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of *Taenia*

- species from humans. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48 (9). pp. 3350-3352.
- Nkouawa, A.; Sako, Y.; Li, T.; Chen, X.; Nakao, M.; Yanagida, T.; Okamoto, M.; Giraudoux, P.; Raoul, F.; Nakaya, K.; Xiao, N.; Qiu, J.; Qiu, D.; Craig, P.S.; Ito, A. A loop-mediated isothermal amplification method for differential identification of *Taenia* tapeworms from human: application to a field survey. *Parasitology International* 2012; 61. pp. 723-725.
- Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 2000; 28 (12). E63.
- Parida, M.; Horioka, K.; Ishida, H.; Dash, P.K.; Saxena, P.; Jana, A.M.; Islam, M.A.; Inoue, S.; Hosaka, N.; Morita, K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43 (6). pp. 2895-2903.
- Parida, M.; Posadas, G.; Inoue, S.; Hasebe, S.; Morita, K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile Virus. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42 (1). pp. 257-263.
- Parida, M.; Sannarangaiah, S.; Dash, P. K.; Rao, P.V.L.; Morita, K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology* 2008; 18. pp. 407-421.
- Parida, M.; Santhosh, S.R.; Dash, P.K.; Tripathi, N.K.; Saxena, P.; Ambuj, S.; Sahni, A.K.; Lakshmana Rao, P.V.; Morita, K. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44 (11). pp. 4172-4178.
- Paris, D.H.; Imwong, M.; Faiz, A.M.; Hasan, M.; Yunus, E.B.; Silamut, K.; Lee, S.J.; Day, N.P.; Dondorp, A.M. Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; 77 (5). pp. 972-976.
- Poole, C.B.; Tanner, N.A.; Zhang, Y.; Evans, T.C. Jr, Carlow, C.K. Diagnosis of brugian filariasis by loop mediated isothermal amplification. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2012; 6 (12). E1948.
- Poon, L.L.; Wong, B.W.; Ma, E.H.; Chan, K.H.; Chow, L.M.; Abeyewickreme, W.; Tangpukdee, N.; Yuen, K.Y.; Guan, Y.; Looareesuwan, S.; Peiris, J.S. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clinical Chemistry* 2006; 52 (2). pp. 303-306.
- Roelfsema, J.H.; Nozari, N.; Pinelli, E.; Kortbeek, L.M. Novel PCRs for differential diagnosis of cestodes. *Experimental Parasitology* 2016; 161. pp. 20-26.
- Sekiguchi, J.; Asagi, T.; Miyoshi-Akiyama, T. Kasai, A.; Mizuguchi, Y.; Araake, M.; Fujino, T.; Kikuchi, H.; Sasaki, S.; Watari, H.; Kojima, T.; Miki, H.; Kanemitsu, K.; Kunishima, H.; Kikuchi, Y.; Kaku, M.; Yoshikura, H.; Kuratsuji, T.; Kirikae, T. Outbreaks of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45(3). pp. 979-989.
- Snounou, G. Rapid, sensitive and cheap molecular diagnosis of malaria: is microscopy on the way out? *Future Microbiology* 2007; 2. pp. 477-480.
- Takagi, H.; Itoh, M.; Kasai, S.; Yahathugoda, T.C.; Weerasooriya, M. V.; Kimura, E. Development of loop-mediated isothermal amplification method for

- detecting *Wuchereria bancrofti* DNA in human blood and vector mosquitoes. *Parasitology International* 2011; 60 (4). pp. 493-497.
- Thomas, L.F. Landscape analysis: control of *Taenia solium*. *World Health Organization (WHO)* 2015.
- Tomita, N.; Mori, Y.; Kanda, H.; Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 2008; 3 (5). pp. 887-882.
- Winkler, A.S.; Richter, H. Landscape analysis: management of neurocysticercosis with an emphasis on low- and middle-income countries. *World Health Organization (WHO)* 2015.
- Winkler, A.S. Neurocysticercosis in Sub-Saharan Africa: a review of prevalence, clinical characteristics, diagnosis and management. *Pathogens and Global Health* 2012; 106 (5). pp. 261-274.
- World Health Organization (WHO). Assembling a framework for intensified control of taeniasis and neurocysticercosis caused by *Taenia solium*. 2014.
- World Health Organization (WHO). Report of the WHO expert consultation on foodborne trematode infections and Taeniasis/Cysticercosis. 2009.
- Xu, J.; Rong, R.; Zhang, H.Q.; Shi, C.J.; Zhu, X.Q.; Xia, C.M. Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *International Journal of Parasitology* 2010; 40 (3). pp. 327-331.
- Zablon Kithinji Njiru. Loop-Mediated Isothermal Amplification technology: Towards Point of Care Diagnostics. *PLoS NTD*, 2012. Vol. 6, e1572.
- Zhibing, L.; Yanlei, Z.; Houshuang, Z.; Yongzhi, C.Z.; Jie, C.; Jinlin, Z. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCD method targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology* 2011; 185 (2-4). pp. 293-300.

7. ANEXOS

7.1. Esquema completo del funcionamiento del método LAMP

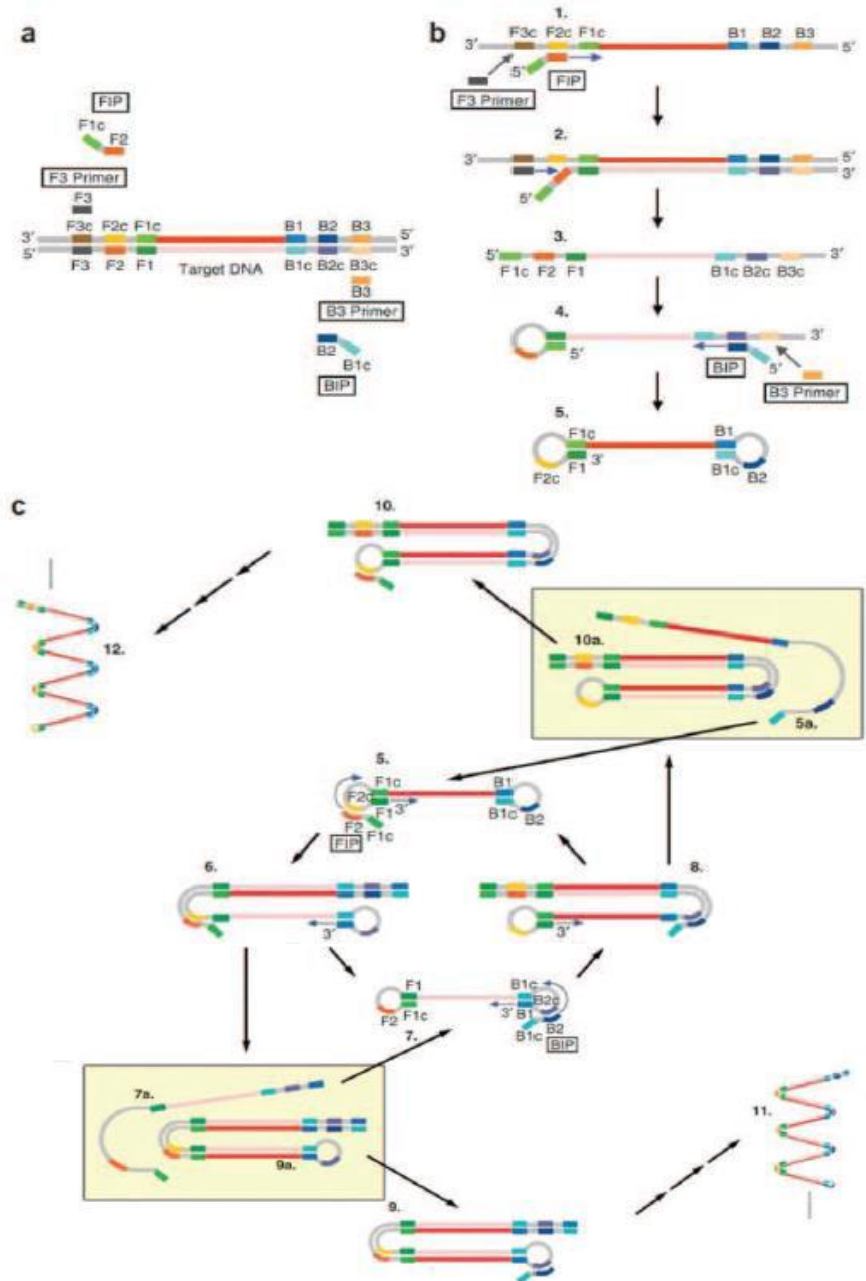
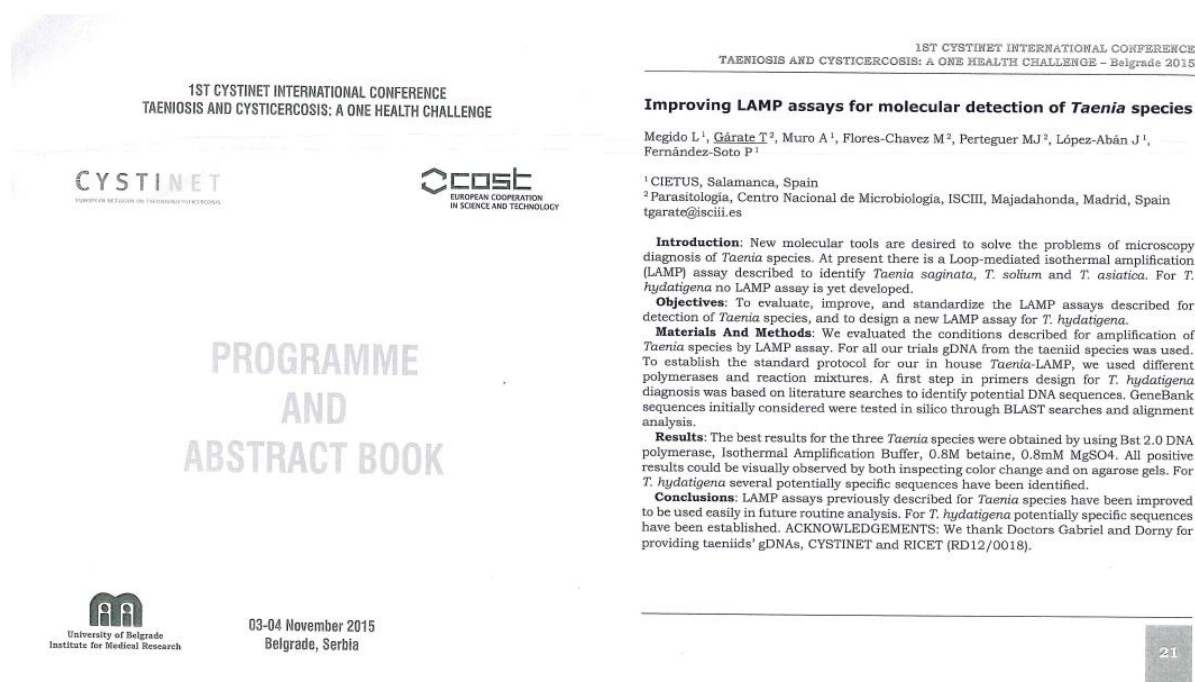


Figura 1. Fundamento del LAMP. **a:** Diseño de cebadores: seis regiones diferentes constituyen el ADN diana. Se utilizan los dos cebadores internos y los dos externos (FIP y BIP – F3 y B3). **b:** Formación de la estructura. La región F2 se une a su complementaria F2c en el ADN diana y comienza la elongación. La amplificación continúa con BIP. F3 hibrida con F3c y se inicia la síntesis de ADN por desplazamiento de cadena. La cadena formada desde FIP es reemplazada y liberada para formar una estructura en forma de bucle en el extremo 3' por las regiones F1 y F1c. La síntesis continúa con una hebra sencilla como molde para los cebadores BIP y B3, y del mismo modo en que ya se ha descrito se genera un doble bucle (5). **c:** La amplificación en ciclos tiene lugar utilizando esta estructura como molde y la síntesis de ADN se produce con F1 a partir del extremo 3'. La elongación se inicia con la unión de FIP a la hebra sencilla en F2c. Tras varios ciclos se genera una estructura (7) complementaria a la estructura 5. Ésta última se produce a partir de la 8. Las estructuras 9 y 10 se generan a partir de 6 y 8, respectivamente, y se sintetizan estructuras cada vez más largas (11 y 12) (tomado con modificaciones de Tomita et al., 2008).

7.2. Comunicaciones presentadas en congresos internacionales

Comunicación 1. 1st CYSTINET International Conference Taeniosis and Cysticercosis: A One Health Challenge (Belgrado, Serbia), 3-4 de noviembre de 2015. Figura el resumen del trabajo presentado.



Comunicación 2. Stakeholder Meeting on *T. solium* Taeniosis/Cysticercosis Diagnostic Tools (WHO) (Ginebra, Suiza), 17-18 de diciembre de 2015.

